Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Der Nachweis des Isoenzyms 5 der Sauren Phosphatase als diagnostisches Kriterium für die Diagnose der Haarzell–Leukämie

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von
Rosmarie Weber
aus Dürmentingen

1979

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Der Nachweis des Isoenzyms 5 der Sauren Phosphatase als diagnostisches Kriterium für die Diagnose der Haarzell–Leukämie

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von
Rosmarie Weber
aus Dürmentingen

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. H. HEIMANN
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. H. W. von HEYDEN
	(Professor Dr. H. D. WALLER)
2. Berichterstatter:	Professor Dr. K.-H. BICHLER

Herr Professor Dr. H.D. WALLER hat mir freundlicherweise erlaubt, in seiner Abteilung eine experimentelle Arbeit durchzuführen. Dafür möchte ich ihm meinen Dank aussprechen.

Herrn Privatdozent Dr. H.W. von HEYDEN gebührt mein außerordentlicher Dank für das überlassene Thema, für seine Anleitung und die Durchsicht sowie Korrektur des Manuskriptes.

Frau J. PEUKER danke ich herzlich für die technische Unterstützung beim Durchführen der Experimente.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
I.1.	Vorkommen der Sauren Phosphatase	1
I.2.	Biochemische Charakterisierung der Sauren Phosphatase	1
I.3.	Biologische Bedeutung der Sauren Phosphatase	2
I.4.	Isoenzyme der Sauren Phosphatase	3
I.5.	Fragestellung	3
II.	METHODEN	5
II.1.	Isolierung von Leukozyten und Thrombozyten	5
II.1.a.	Isolierung von Leukozyten	5
II.1.b.	Isolierung von mononukleären Zellen	5
II.1.c.	Isolierung von Granulozyten	5
II.1.d.	Trennung von mononukleären Zellen in Monozyten und Lymphozyten	6
II.1.e.	Isolierung von mononukleären Zellen aus Thymus und Milz	6
II.1.f.	Isolierung von Thrombozyten	6
II.1.g.	Elimination von kontaminierenden Thrombozyten und Erythrozyten	6
II.2.	Zellzählung und Bestimmung der Viabilität	7
II.3.	Lysierung der angereicherten Zellen	7
II.4.	Zytochemische Färbungen	7
II.4.a.	Zellausstriche	7
II.4.b.	Saure Phosphatase-Färbungen und Tartrathemmung	7
II.5.	Disk-Elektrophorese	8
II.5.a.	Elektrophoretische Auftrennung der Sauren Phosphatase	8
II.5.b.	Färbung zur Darstellung der Isoenzyme der Sauren Phosphatase	10
II.5.c.	Densitometrie	11
II.6.	Quantitative Bestimmung der Gesamt-Saure-Phosphatase-Aktivität aus Zellysaten	11

III. ERGEBNISSE 12
III.1. Aktivitäten der Gesamt-Saure-Phosphatase in leukämischen und normalen weißen Blutzellen 15
III.2. Isoenzym-Muster der Sauren Phosphatase normaler Zellpopulationen 15
III.3. Isoenzym-Muster der Sauren Phosphatase aus Zellen von Patienten mit nicht-leukämischen Erkrankungen 17
III.4. Isoenzym-Muster der Sauren Phosphatase aus Zellen von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie und von Patienten mit akuter Leukämie 18
III.5. Isoenzym-Muster der Sauren Phosphatase aus Zellen von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie 19
III.6. Isoenzym-Muster der Sauren Phosphatase aus Zellen von Patienten mit Haarzell-Leukämie 20
III.6.a. Verteilung der Isoenzyme der Sauren Phosphatase und ihre Tartratresistenz 20
III.6.b. Isoenzym-Muster der Sauren Phosphatase mononukleärer, adhärenter und nicht-adhärenter Zellen aus Venenblut und mononukleärer Zellen aus der Milz 22
III.6.c. Vergleich von zytochemischem und gelelektrophoretischem Nachweis des Isoenzyms 5 der Sauren Phosphatase 25

IV. DISKUSSION 27

V. ZUSAMMENFASSUNG 31

LITERATURVERZEICHNIS 32

Die in der vorliegenden Arbeit verwandten

A B K Ü R Z U N G E N sind:

AL	Akute Leukämie
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
HZ	Haarzellen
HZL	Haarzell-Leukämie
IsE	Isoenzyme
SP	Saure Phosphatase
TRSP	Tartratresistente Saure Phosphatase

I. E I N L E I T U N G

I.1. Vorkommen der Sauren Phosphatase (SP)

SP wurde in Mikroorganismen (z.B. in Staphylokokken, E.coli, Hefe- und Schimmelpilzen), in Pflanzen (z.B. in Gerste, Mandeln, Tabakblättern, Zitrusfrüchten) und in Säugetieren (z.B. in Leber und Nieren von Ratten, Affenprostata) nachgewiesen.
Beim Menschen wurden besonders hohe Aktivitäten dieses Enzyms im Prostata-, Leber-, Nieren-, Milz- und Pankreasgewebe, im Sperma, in Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten festgestellt. Eine erhöhte Aktivität der SP im Plasma wird z.B. bei Hämolyse und Thrombozytose durch Freiwerden des Enzyms aus den Erythrozyten bzw. Thrombozyten und ganz besonders bei metastasierendem Prostata-Carcinomen gemessen (51).

I.2. Biochemische Charakterisierung der SP

Die SP ist eine Orthophosphorsäure-monoester-phosphohydrolase. Sie katalysiert eine P-O-Spaltung nach folgender Reaktion:

Durch Anlagerung von H_2O wird für jedes frei werdende Mol Phosphat ein ^{18}O-Atom eingeführt (29). Die Enzymaktivität kann über den Anteil des frei gewordenen (phosphatfreien) aromatischen Alkohols (ROH) bestimmt werden: falls p-Nitrophenylphosphat als Substrat verwendet wird, direkt photometrisch nach Alkalisieren des freien Nitrophenols zum gelb gefärbten Nitrophenolat und falls Naphtholderivatphosphate als Substrat dienen, indirekt photometrisch nach Kupplung

des freien Naphtholderivates an Diazoverbindungen zu einem vollständig unlöslichen Farbstoff (9,17,52).

Die Aktivität der SP aus verschiedenen Geweben und Blutzelltypen zeichnet sich durch gering differierende Optima innerhalb des pH-Bereiches 4,5 - 6,0 aus; es bestehen jedoch deutliche Unterschiede hinsichtlich der Substratspezifitäten. So bevorzugen die SP sowohl aus Erythrozyten als auch aus Thrombozyten α-Glycerophosphat als Substrat, während die SP aus der Prostata α-Naphthylphosphat und p-Nitrophenylphosphat gleich gut spaltet. Ein Teil der SP ist durch Tartrat hemmbar bzw. gegenüber Tartrat resistent. Der Hemmechanismus durch Tartrat ist eindeutig kompetitiv (29, 45).
Der tartratlabile Anteil der SP im Serum stammt überwiegend aus der Prostata und ist im Falle erhöhter Aktivität von diagnostischer Bedeutung für das Vorliegen eines Prostata-Carcinoms (20,29,45,52).
Im Klinikbetrieb setzte sich für Routinebestimmungen der Gesamt-SP-Aktivität im Serum p-Nitrophenylphosphat als Substrat durch. Zur Messung der Prostata-SP wird der tartratlabile Anteil bestimmt. Dagegen werden für den zytochemischen sowie gelelektrophoretischen Enzymnachweis ausschließlich Naphtholderivate empfohlen (5,8,9,17,22,30,46).

I.3. Biologische Bedeutung der SP

Die SP ist in besonders hoher Konzentration in den Lysosomen enthalten, die z.B. in Granulozyten z.T. den neutrophilen und eosinophilen Granula entsprechen. Die Funktion lysosomaler Enzyme liegt vor allem in ihrer bakteriziden Wirkung. Daneben ist ein beträchtlicher Anteil der SP auf andere zelluläre Bestandteile wie Mitochondrien, Mikrosomen, Kerne und lösliches Zytoplasma verteilt (1,6,13,33). Die Aktivität der membrangebundenen SP kann erst nach Ablösen durch ein Detergens z.B. Triton X-100 nachgewiesen

werden.

I.4. Isoenzyme (IsE) der SP

Mit der Gelelektrophorese und Chromatographie konnte BARKA (6,7) vier verschiedene Banden der SP darstellen. In normalen und pathologischen Leukozyten vom Menschen wiesen LI et al. (36) fünf verschiedene IsE nach. Diese wurden entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeit als IsE 1,2,3,4 und 5 bezeichnet, wobei das letzte am weitesten zur Kathode wanderte. Später beschrieben diese Autoren noch zwei weitere IsE, nämlich das IsE 0 und das IsE 3b (37). Im Gegensatz zu allen anderen IsE wies sich das IsE 5 durch seine Resistenz gegenüber Tartrat aus. IsE 0 war typisch für Gaucher-Zellen; IsE 1,2 und 4 für Neutrophile; IsE 1 und 4 für Monozyten; IsE 3 für Lymphozyten und Thrombozyten; IsE 3b für pathologische Blasten; das tartratresistente IsE 5 für Haarzellen (HZ).
Im Gegensatz zur gelelektrophoretischen Darstellung gelang zytochemisch keine Differenzierung der einzelnen IsE mit Ausnahme des IsE 5 nach Inkubation mit Tartrat.

Die zytochemische Darstellung der tartratresistenten SP (TRSP) hat in letzter Zeit besondere Bedeutung für die Diagnose einer Haarzell-Leukämie (HZL; leukämische Retikuloendotheliose) erfahren (1,47,55). Es handelt sich hierbei um eine chronische Leukämie mit wahrscheinlich lymphoproliferativem Charakter (14,16,19,21,24,41,42,32).

I.5. Fragestellung

Die prozentuale Berechnung der einzelnen IsE der SP gelang erst im Anschluß an die diskelektrophoretische Auftrennung mit Hilfe der Densitogramme.
Hierbei wurde auf den Nachweis des IsE 5 in angereicherten normalen und pathologischen Zellpopulationen von Patienten

mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL), chronisch myeloischer Leukämie (CML), akuter Leukämie (AL) und besonders mit HZL Wert gelegt.
Ziel der Untersuchung war daher festzustellen, inwieweit das IsE 5 für HZ spezifisch ist.

II. METHODEN

II.1. Isolierung von Leukozyten und Thrombozyten

Die Anreicherungsverfahren wurden nach der Vorschrift von BÖYUM (11,12) durchgeführt.

II.1.a. Isolierung von Leukozyten

Als Trennmedium diente ein Gemisch aus 20 ml Na^+-Metrizoate-Lösung^R (75 g%; Dichte 1,457 g/ml bei 20°C; NYEGAARD & CO. AS, Oslo, Norwegen), 5,58 g Dextran T 500 (PHARMACIA FINE CHEMICALS AB, Uppsala, Schweden) und 119 ml aqua dest. mit einer Dichte von 1,080 g/ml bei 20°C. Ein Teil Trennmedium wurde mit zwei Teilen heparinisierten Venenblutes überschichtet. Anreicherung der Leukozyten im Überstand durch Absedimentieren der Erythrozyten bei 1 g.

II.1.b. Isolierung von mononukleären Zellen

Heparinisiertes Venenblut wurde mit Phosphatpuffer (0,176 Mol/l $NaHPO_4$ x 2 H_2O + 0,536 Mol/l KH_2PO_4 + 0,133 Mol/l NaCl + 2% Penicillin, in aqua dest., pH 7,2) im Verhältnis 1:2 verdünnt und über Lymphoprep^R (Dichte 1,077 ± 0,001 g/ml bei 20°C; NYEGAARD & CO.AS) in der Relation 2:1 geschichtet. Während Erythrozyten und Granulozyten nach Zentrifugation bei 400 g für 40 min. bei Raumtemperatur sedimentierten, wurden die mononukleären Zellen im Überstand angereichert.

II.1.c. Isolierung von Granulozyten

Die nach (II.1.a.) angereicherten Leukozyten wurden nach (II.1.b.) weiterbehandelt. Anreicherung der Granulozyten im Sediment.

II.1.d. Trennung von mononukleären Zellen in Monozyten und Lymphozyten

In dankenswerter Weise wurden separierte Monozyten- und Lymphozytenpopulationen von Herrn Dr.J.G.SAAL (Chirurgische Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Experimentelle Chirurgie und Immunologie, Direktor Prof.Dr.G.RIETHMÜLLER) zur Verfügung gestellt (48).

II.1.e. Isolierung von mononukleären Zellen aus Thymus und Milz

Zerkleinerung von Thymus- bzw. Milzgewebe in Nährmedium (RPMI 1640, 10% Fetales Rinderserum; ASSOCIATED BIOCHEMIC SYSTEMS, Buffalo, New York). Anreicherung der mononukleären Fraktion mit Lymphoprep^{R} (s.II.1.b.).

II.1.f. Isolierung von Thrombozyten

Freundlicherweise wurden Thrombozyten von Herrn Dr.O.NERKE (Medizinische Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin II, Direktor Prof.Dr.H.D.WALLER) modifiziert nach BAENZINGER und MAJERUS (4) angereichert.

II.1.g. Elimination von kontaminierenden Thrombozyten und Erythrozyten

Während der Anteil der Thrombozyten durch mehrmaliges Waschen mit Phosphatpuffer reduziert wurde, wurde derjenige der Erythrozyten durch maximal dreimalige Inkubation mit Tris-Ammoniumchlorid-Lösung((9 Teile wässrige 0,83%ige NH_4Cl-Lösung auf 1 Teil 2 M Tris-Puffer (Tris-hydroxy-methyl-amino-methan 60,4 g + 25%ige HCl 60,4 g in 1000 ml aqua dest., pH 7,4)) bei 37^{o}C eliminiert.

II.2. Zellzählung und Bestimmung der Viabilität

Die Zellzahl wurde in einer NEUBAUER-Zählkammer und die Viabilität mit der Trypanblau-Ausschlußmethode (Trypanblau-Lösung 1%ig) bestimmt.

II.3. Lysierung der angereicherten Zellen

Das Zellsediment wurde in eine Triton X-100 (SERVA, Heidelberg) Lösung ((5 Vol.% in ß-Alanin-Acetat-Puffer (s.II.5.a.)) aufgenommen, sodaß eine Zellkonzentration von 1 x 10^8 Zellen/ml resultierte. Anschließend erfolgte Kryolyse durch sechsmaliges alternierendes Frieren/Tauen in einem Aceton-Trockeneis-Gemisch. Nach einer 15 min. langen Zentrifugation bei 1000 g wurde der Debris-freie Überstand in aliquots zu 100 µl bei 20°C eingefroren.

II.4. Zytochemische Färbungen

II.4.a. Zellausstriche

Albumin-Ausstriche (Albumin und Zellen im Verhältnis 1:1 gemischt) wurden mit 60%igem Aceton 30 sec. lang fixiert.

II.4.b. SP-Färbungen und Tartrathemmung

Die Methode beruhte auf Vorschriften von LI et al. (36) und YAM et al. (54).

Verwendete Substanzen:

- Diäthylbarbiturat-Natrium (MERCK, Darmstadt)
- Dimethylsulfoxid (MERCK)
- Naphthol AS-BI phosphat, Na-Salz (SERVA)
- Natriumacetat krist. (MERCK)
- Natriumnitrit krist. (MERCK)
- Pararosanilin (CHROMA-Gesellschaft Schmid & Co., Stuttgart-Untertürkheim)
- L(+)-Weinsäure (Tartrat), (MERCK)

Stammlösungen:

- Natriumnitrit: 580 mMol/l aqua bidest.
- Pararosanilin: 140 mMol/l 2 N HCl
- Veronal-Acetat-Puffer, pH 7,6:

Diäthylbarbiturat-Natrium	28,6	mMol/l
Natriumacetat	28,6	mMol/l
0,1 N HCl	172	ml/l

in aqua bidest.

Die Ausstriche wurden 4 Stunden lang in folgendem Substratgemisch inkubiert:

Naphthol AS-BI phosphat	0,68	mMol/l
Dimethylsulfoxid	930	mMol/l
Pararosanilin	1,40	mMol/l
Natriumnitrit	5,80	mMol/l

in Veronal-Acetat-Puffer.

Zur Demonstration der TRSP wurde dem Substratgemisch 50 mMol Tartrat/l zugefügt.

Kernfärbung der Ausstriche mit Hämalaun (MERCK), 90 min. lang, mit anschließender Bläuung in Leitungswasser für 45 min.

II.5. Disk-Elektrophorese

II.5.a. Elektrophoretische Auftrennung der SP

Die Durchführung der Elektrophorese wurde nach AXLINE (3) und LI et al. (36,37) modifiziert.

Verwendete Apparaturen:

- Flachgel-Elektrophorese-Apparatur (DESAGA, Heidelberg)
- Frigostat 220 V (DESAGA)
- Netzanschlußgerät 600 V / 600 mA (DESAGA)

Verwendete Substanzen:

- Acrylamid reinst, 2 x krist. (SERVA, Heidelberg)
- ß-Alanin (SERVA)
- Ammoniumpersulfat (SERVA)
- Eisessig (MERCK, Darmstadt)
- N,N'-Methylenbisacrylamid (SERVA)

- Natriumacetat krist. (MERCK)
- Riboflavin (SERVA)
- Saccharose (SERVA)
- N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (SERVA)
- Triton X-100 (SERVA)

Lösungsansätze, modifiziert nach MAURER (40):

Lösung 1)	1 N NaOH	48,00 Vol.%
	Eisessig	17,20 Vol.%
	Tetramethyläthylendiamin	4,00 Vol.%
Lösung 2)	1 N NaOH	48,00 Vol.%
	Eisessig	2,87 Vol.%
	Tetramethyläthylendiamin	0,46 Vol.%
Lösung 3)	Acrylamid	30,00 g%
	Bisacrylamid	0,80 g%
Lösung 4)	Acrylamid	10,00 g%
	Bisacrylamid	2,50 g%
Lösung 5)	Riboflavin	8,00 mg%
Lösung 6)	Saccharose	40,00 g%

Trenngel-Ansatz: Acrylamid 7,5%; pH 4,4

1 Teil Lösung 1,
2 Teile Lösung 3 und
1 Teil 0,5%iges Triton X-100 wurden zusammen gemischt mit 4 Teilen frisch angesetzter 0,28%iger wässriger Ammoniumpersulfat-Lösung.
Polymerisationszeit 30 min.

Sammelgel-Ansatz: Acrylamid 2,5%; pH 9,6

1 Teil Lösung 2,
2 Teile Lösung 4 und
4 Teile aqua bidest. wurden zusammen gemischt mit
1 Teil Lösung 5.
Das Sammelgel wurde photopolymerisiert durch Tageslichtbestrahlung. Polymerisationszeit ca. 45 min.

ß-Alanin-Acetat-Puffer (Elektrodenpuffer), pH 4,4:

ß-Alanin	35 mMol/l
Eisessig	10 mMol/l

in aqua bidest.

Die Elektrophorese wurde mit ß-Alanin-Acetat-Puffer als Elektrodenpuffer bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Die Spannung für die Konzentrierung der Substanzen innerhalb des Sammelgels betrug 200 V; Laufzeit ca. 30 min.
Die Spannung für die Auftrennung der Proben innerhalb des Trenngels betrug 390 V; Trennzeit 90 min.
Anschließend Inkubation der Gele für 30 min. in 0,1 M Acetatpuffer pH 5,0 (s.II.5.b.).

II.5.b. Färbung zur Darstellung der IsE der SP

Die Methode stützte sich auf Ausführungen von ALLEN und GOCKERMANN (1), AXLINE (3), LI et al. (37) und YAM et al. (54).

Verwendete Substanzen:

- Diazo-echtgranat GBC (Fast Garnet GBC salt, SERVA, Heidelberg)
- α-Naphthylphosphat (MERCK)

Acetat-Puffer 0,1 M, pH 5,0:

Natriumacetat	100 mMol/l
Eisessig	42 mMol/l

in aqua bidest.

In der Inkubationslösung lagen folgende Substratkonzentrationen vor:

α-Naphthylphosphat	3,78 mMol/l
Diazo-echtgranat GBC	3,28 mMol/l

in Acetat-Puffer.

Die Inkubationsdauer für die Gele betrug zwischen 30 min. und 180 min. Die enzymatische Nachweisreaktion wurde durch

Einlegen der Gele in 7,5%ige Essigsäure gestoppt.

II.5.c. Densitometrie

Verwendete Apparaturen:

- Pherogramm-Photometer KFE 4 mit λ = 510 und λ = 600 nm (ZEISS, Oberkochen)
- Kompensationsschreiber RE 512 SERVOGOR (METRAWATT, Nürnberg).

Die Apparaturen wurden in dankenswerter Weise von Herrn Prof.Dr.M.EGGSTEIN zur Verfügung gestellt.

II.6. Quantitative Bestimmung der Gesamt-SP-Aktivität aus Zellysaten

Die Aktivitätsbestimmung der Leukozyten-SP wurde in freundlicher Weise von Herrn Dr.W.STEIN (Medizinische Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin IV, Direktor Prof. Dr.M.EGGSTEIN) durchgeführt (2,45).

III. E R G E B N I S S E

Insgesamt konnten folgende IsE nachgewiesen werden: IsE 1, 2,3(3a,3b),4,5(5a,5b).
Tab.I gibt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die IsE 1-5 (in %) und die Gesamtaktivitäten der SP separierter Blutzellpopulationen (in IE/10^7 Zellen) wieder.

Tab.I: Mittelwerte und Standardabweichungen der IsE-Fraktionen 1-5 (in %) und Gesamtaktivitäten der SP (in IE/10^7 Zellen) aus normalen und leukämischen weißen Blutzellen sowie aus Thrombozyten.
n = Anzahl der Personen
m = Anzahl der Bestimmungen

			Isoenzyme in % der SP					SP (IE/10^7Z)
			1	2	3	4	5	
Mononukl Zellen	n=5		6,9 ± 2,6	24,9 ± 6,0	36,1 ± 8,1	30,2 ± 0,6	1,9 ± 0,5	50,4 ± 15
Lymphozyten	n=8		8,3 ± 4,0	20,5 ± 4,9	61,8 ± 10,6	7,4 ± 7,0	2,0 ± 2,1	14,3 ± 12 n=5
Monozyten	n=7		7,9 ± 2,1	22,4 ± 8,1	35,6 ± 5,2	31,6 ± 5,7	2,5 ± 1,7	89,6 ± 44 n=3
Granulozyten	n=6		9,4 ± 3,8	34,3 ± 5,6	28,5 ± 3,5	27,8 ± 4,7	0	66,2 ± 15,5 n=5
Thrombozyten	n=5		16,6 ± 4,6	15,6 ± 4,0	64,5 ± 2,7	3,3 ± 5,4	0	0,86 ± 0,6
CLL-Zellen	n=14	m=22	10,4 ± 4,7	20,8 ± 11,8	46,2 ± 11,6	17,1 ± 11,9	5,5 ± 10,1	10,7 ± 10,4 m=20
HZL-Zellen	n=9	m=16	7,8 ± 4,1	23,8 ± 10,1	32,4 ± 8,5	16,2 ± 9,0	19,8 ± 11,8	46,4 ± 25 m=11
AL-Zellen	n=8	m= 9	8,8 ± 6,4	24,6 ± 8,7	44,4 ± 10,4	22,2 ± 8,3	0	43,6 ± 26
CML-Leuk	n=8	m= 9	11,6 ± 4,3	23,3 ± 7,6	42,6 ± 11,1	22,5 ± 7,3	0	115 ± 92
CML-Mononukl Z.	n=5		9,5 ± 4,5	25,2 ± 5,8	42,1 ± 13,3	23,2 ± 12	0	53 ± 47

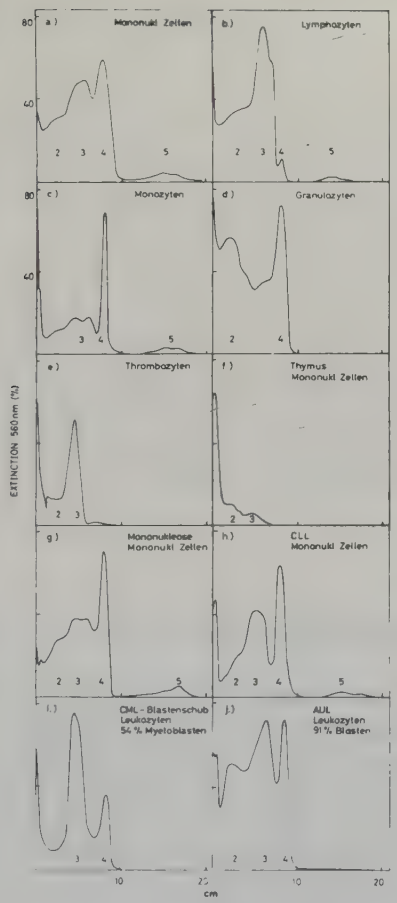


Abb.1: Repräsentative Densitogramme der IsE der SP aus mononukleären Zellen (a), Lymphozyten (b), Monozyten (c), Granulozyten (d), Thrombozyten (e), mononukleären Zellen aus Thymus (f), mononukleären Zellen eines Patienten mit infektiöser Mononukleose (g), mononukleären Zellen eines Patienten mit CLL (h), Leukozyten eines Patienten mit CML im Blastenschub (i) und aus Leukozyten eines Patienten mit akuter undifferenzierter Leukämie (AUL) (j).
Ziffern kennzeichnen die einzelnen IsE.

Die Ergebnisse der Einzelmessungen sind für Zellpopulationen Gesunder (mononukleäre Zellen, Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und Thrombozyten) in Tab.II, für Zellen von Patienten mit CML in Tab.IV, von Patienten mit AL in Tab.V, von Patienten mit CLL in Tab.VI, von Patienten mit HZL in Tab.VII und Tab.VIII aufgeführt. In Tab.III sind die IsE-Anteile der SP aus Thymozyten, aus Zellen von Patienten mit infektiöser Mononukleose und Viruspneumonie, aus dem Serum von Patienten mit Prostata-Carcinom sowie aus Prostata-Adenom- bzw. Prostata-Carcinom-Gewebe zusammengefaßt. Für die Abbildungen wurden typische und repräsentative Densitogramme ausgewählt. Abb.1 zeigt zusammenfassend IsE-Profile der SP aus separierten Zellen Gesunder sowie aus Zellen von Patienten mit infektiöser Mononukleose, CLL,CML und akuter undifferenzierter Leukämie.

III.1. Aktivitäten der Gesamt-SP in leukämischen und normalen weißen Blutzellen (Tab.I)

Es ist auffällig, daß die Werte der gemessenen Aktivitäten sehr stark schwankten, besonders bei den Zellen von Patienten mit CLL, mit HZL und bei Lymphozyten von Normalpersonen. Ausdruck dessen sind die großen Standardabweichungen. Die Reihenfolge der Zellpopulationen mit abnehmender Gesamt-Aktivität war folgende: nicht fraktionierte Leukozyten von Patienten mit CML, Monozyten und Granulozyten von Normalpersonen, mononukleäre Zellen von Patienten mit CML, mononukleäre Zellen von Normalpersonen, von Patienten mit HZL, von Patienten mit AL, Lymphozyten Gesunder, mononukleäre Zellen von Patienten mit CLL und Thrombozyten Gesunder. Die höchsten Aktivitäten wurden in Leukozyten von Patienten mit CML mit 115 ± 92 IE/10^7 Zellen, die niedrigsten in Thrombozyten Gesunder mit 0,86 ± 0,6 IE/10^7 Zellen gefunden.

III.2. IsE-Muster der SP normaler Zellpopulationen (Tab.II)

Die mononukleäre Zellfraktion, bestehend aus Lymphozyten und Monozyten, wies einen starken Anteil des IsE 3 und einen fast gleich großen des IsE 4 auf. Wie Abb.1a-c zeigt, addierten sich im IsE-Profil der mononukleären Zellen (Abb. 1a) gleichzeitig die Profile der lymphozytären (Abb.1b) und monozytären (Abb.1c) Subfraktion. Denn nach Auftrennung der mononukleären Fraktion wiesen die IsE-Profile der Lymphozyten als Charakteristikum das starke Überwiegen von IsE 3 und das fast vollständige Fehlen des IsE 4 auf. Dagegen waren die Monozyten durch einen schmalen und hohen Peak des IsE 4 gekennzeichnet.
Granulozyten zeigten den relativ höchsten Anteil des IsE 2 mit 34,3 ± 5,6 % und einen hohen Anteil des IsE 4 auf (Abb. 1d). Thrombozyten waren durch IsE 3a charakterisiert (Abb. 1e), Thymozyten durch IsE 1 und vollständiges Fehlen von IsE 4 (Abb.1f, Tab.III).

Das tartratresistente IsE 5 war sowohl in Lymphozyten und Monozyten (Tab.I), jedoch nicht in Granulozyten, Thrombozyten und Thymozyten (Tab.I,III) nachzuweisen.

Tab.II: Einzelbestimmungen der IsE der SP (in %) aus mononukleären Zellen, Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und Thrombozyten Gesunder.

Native Zellpopulationen	Isoenzyme in % der SP									Ges.SP (iE 10^9/l)	Kontaminierende Population (%)
	1	2	3	a	b	4	5	a	b		
Mononukl. Zellen	7,2	28,8	32	22,5	9,5	29,7	2,3	1,7	0,6	71,0	22,4 Monozyten
	9,6	28,8	31,1	20,9	10,2	27,9	2,6	1,8	0,8	56,0	15,5 Monozyten
	3,4	14,7	49,8	31,3	18,5	30,7	1,4	0,6	0,8	31,0	5,0 Monozyten
	5,2	24,2	36,1	24,2	11,9	32,7	1,8			50,0	19,6 Monozyten
	9,2	28,0	31,9	22,0	9,9	29,3	1,6			44,0	9,8 Monozyten
Lymphozyten	5,6	20,2	52,6			20,7	0,9			3,9	
	4,7	13,6	79,6	60,6	19,0	1,5	0,6	0,4	0,2	35,0	
	5,5	16,6	73,6			2,9	1,4	1,1	0,3	13,5	
	6,5	25,6	62,6	50,1	12,5	2,9	2,4	1,8	0,6		
	6,7	18,3	65,3	48,3	17	5,3	4,4	4,2	0,2	8,0	6,3 Monozyten
	7,1	23,3	54			14,9	0,7				
	12,9	19,2	57			9,7	1,2				
	15,2	28,8	49,2	++	+	2,0	4,8			11,4	
Monozyten	7,7	17,5	32,7			37,1	5,0				
	9,7	9,7	44,4	25,4	19,0	32,9	3,3	1,5	1,8	82,0	
	8,9	22,3	41,7	27,2	14,5	25,0	2,1	1,4	0,7		
	8,3	35,3	29,4	19,6	9,8	26,1	0,9	0,8	0,1		
	9,3	22,0	34,5	18,7	15,8	29,2	5,0	2,9	2,1	137,0	11,2 Lympho
	5,7	25,6	36,2	21,0	15,2	30,4	2,1			50,0	
	3,7	28,9	(34,1)			31,3	2	0,7	1,3		
Granulozyten	5,7	40,2	34,4			19,7	0				7,2 Mononukl.
	9,0	36,0	29,6	16,1	13,5	25,4	0			39,0	15,3 Mononukl
	7,3	30,5	30,0			32,2	0			77,0	8,5 Mononukl
	15,7	25,5	26,6	17,9	8,7	32,2	0			75,0	14,0 Mononukl
	6,5	39,4	24,6			29,5	0			71,0	
	12,0	33,9	26,3			27,8	0			69,0	8,5 Mononukl
Thrombozyten	23,2	12,8	(64)	62,8	1,2	0	0			0,6	
	14,8	12,5	(60,2)	55,7	4,5	12,5	0			0,6	
	11,1	21,2	(67,7)	63,0	4,7	0	0			0,8	
	15,3	13,9	(67,2)	64,8	2,4	3,6	0			1,9	
	18,8	19,5	(61,7)	58,6	3,1	0	0			0,4	

III.3. IsE-Muster der SP aus Zellen von Patienten mit nicht-leukämischen Erkrankungen (Tab.III)

Die IsE-Profile der mononukleären Fraktion von Patienten mit infektiöser Mononukleose entsprachen im Prinzip denjenigen mononukleärer Zellen von Normalpersonen. Ein Beispiel wird in Abb.1g gezeigt.
Im Serum von 4 Patienten mit Prostata-Carcinom war in jedem der Fälle IsE 5 mit einem Anteil zwischen 4,0% und 14,5% nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnte aus Prostata-Carcinom- und -Adenomgewebe kein IsE 5 isoliert werden.

Tab.III: IsE der SP (in %) aus Thymuszellen, Leukozyten von Patienten mit infektiöser Mononukleose und Viruspneumonie sowie aus dem Serum von Patienten mit Prostata-Carcinom und aus Prostatagewebe selbst.

Diagnosen außer Leukamien	angereicherte Zellpopulation	Isoenzyme in % der SP						
		1	2	3	a	b	4	5
Thymus	Mononukl.	67,3	20,2	12,5	12,5	0	0	0
L.H Mononukleose	Mononukl.	9,3	20,0	29,0	15,4	13,6	41,7	0
W.C Mononukleose	Mononukl.	5,6	20,8	34,5	18,5	16,0	34,5	4,6
B.H. Viruspneumonie	Leukozyten	29,8	12,8	28,6	++	+	28,8	0
F. Prostata - Ca	Serum	8,7	12,8	29,1	22,1	7,0	34,9	14,5
K. "	"	4,4	8,6	35,2	20,1	15,1	43,9	7,9
L. "	"	10,7	27,3	31,3	13,3	18,0	26,7	4,0
M. "	"	9,0	41,0	22,0			22,5	5,5
Prostata - Adenom	Gewebe	4,6	64,5	10,3			20,6	0
Prostata - Ca	"	18,1	55,4	25,3			1,2	0
Prostata - Ca	"	14,3	35,8	23,9	12,4	11,5	26,0	0

III.4. IsE-Muster der SP aus Zellen von Patienten mit CML und von Patienten mit AL (Tab.IV,V)

Abb.1i-j demonstriert je ein Beispiel von CML und akuter undifferenzierter Leukämie mit dem jeweils höchsten Blastenanteil aller untersuchten Fälle von 54% bzw. 91%. Kennzeichnendes Merkmal war das Hervorragen des IsE 3 mit einem Anteil von 63,7% bzw. 45,6%, sowie das Übergewicht des IsE 3b im Falle der AL.
Sowohl in Zellen von Patienten mit CML als auch in solchen von Patienten mit AL fehlte IsE 5 vollständig.

Tab.IV: IsE der SP (in %) aus Blutzellen von Patienten mit CML.

CML	angereicherte Zellpopulation	Isoenzyme in % der SP							Ges.SP (IE/10^3Z)	Leuko (1/ul)	Mononukl. (Rel %)	Myeloblasten (Rel %)
		1	2	3	a	b	4	5				
S G Blastenschub	Leuko	15,2	4,9	63,7			16,2	0	5,0	40 000	57,0	54,0
D A	Leuko	13,6	27,6	34,0	+	+	24,7	0	67,0	254 000	14,0	1,0
D A + 25 Wo	Leuko	11,8	23,5	44,3	+	+	20,4	0	318	55 000	15,5	0,5
D A + 25 Wo	Mononukl	8,8	26,5	64,7	52,9	11,8	0	0	4,0	55 000		3,2
H E	Leuko	16,1	27,9	34,2	+	+	21,7	0	70,3	10 800	18,5	1,0
H H Blastenschub	Leuko	14,0	23,6	46,2	33,3	12,9	16,1	0	65,3	89 000	63,5	13,5
B G	Leuko	14,6	28,9	28,0	+	+	28,4	0	176	235 000	34,0	2,0
B G + 1 Wo	Mononukl	8,0	32,3	31,4	+	+	28,3	0	68,2	148 000		11,1
K	Mononukl	10,0	21,2	35	+	+	33,8	0	7,3	15 000		
K	Leuko	4,0	19,2	48,5	+	+	28,3	0	125	15 000		
M M	Mononukl	2,8	16,7	52,8			27,8	0	64,9	14 200		9,3
M M	Leuko	5,5	21,7	50,5	+	+	22,3	0	61,3	14 200	21,5	2,0
M M + 9 Wo	Mononukl	16,8	19,9	36,7	23,4	13,3	26,5	0	>1000	42 800		8,5
Th E	Mononukl	10,8	28,9	34,3	+	+	26,0	0	60,3	250 000		29,2
Th E	Leuko	9,6	29,7	34,2	+	+	26,4	0	156	250 000	32,5	9,5

Tab.V: IsE der SP (in %) aus Blutzellen von Patienten mit AL.

Akute Leukämie	angereicherte Zellpopulation	Isoenzyme in % der SP							Ges SP (IE/10^7Z)	Leuko (1/µl)	Blasten (Rel %)
		1	2	3	a	b	4	5			
P F undifferenziert	Leuko	6,5	29,2	45,6	+	+++	18,7	0	67,8	229 000	91,0
S K "	Mononukl	6,2	20,1	36,4	15,7	20,7	37,2	0	51,0	30 300	76,0
A G myeloisch	Leuko	7,0	29,4	41,7	+	+++	21,9	0	15,0	73 600	71,0
A G "	Mononukl	2,2	9,4	65,2	+	+++	23,2	0	6,0		81,5
T L "	Mononukl	18,7	20,8	38	25,7	12,3	22,4	0	79,0	1 400	88,5
P J "	Mononukl	4,3	20,2	45,2		45,2	29,6	0,7	17,7	13 500	85,0
G E "	Mononukl	7,8	31,4	52,9	38,2	14,7	7,8	0	45,0	3 500	56,0
G H myelomonozytär	Mononukl	5,9	39,2	35,6	27,8	7,8	19,3	0	50,0	56 000	12,2
N H "	Leuko	20,7	20,7	37,8	17,1	20,7	20,7	0	61,3	74 000	77,5

III.5. IsE-Muster der SP aus Zellen von Patienten mit CLL

Mit einem Anteil von 46,2 ± 11,6 % war IsE 3 in mononukleären Zellen von Patienten mit CLL die weitaus stärkste Fraktion (Tab.I). In den meisten Fällen war zwischen IsE 3a und 3b nicht zu unterscheiden. IsE 4 trat nur in schwacher Konzentration mit durchschnittlich 17,1 ± 11,9 % auf, mit Ausnahme von zwei Patienten, bei denen der Anteil des IsE 4 denjenigen des IsE 3 überwog. Ein charakteristisches Beispiel ist in Abb.1h wiedergegeben. IsE 5 war in 9 von 22 Bestimmungen überhaupt nicht nachweisbar. Bei vier Patienten mit CLL konnte man mehrere Wochen nach der Erstbestimmung kein IsE 5 mehr isolieren.

Tab.VI: IsE der SP (in %) aus mononukleären Zellen von Patienten mit CLL.
(+ x Wo. = x Wochen nach der Erstbestimmung)

CLL	Isoenzyme in % der SP							TR				Ges SP	Leuko	Lympho
	1	2	3	a	b	4	5	a	b	4	5	a	b	(IE/10^9Z)	(1/ul)	(Rel %)
WP (Leuko)	12,3	18,5	36,9			29,2	3,1							1,8	179 000	97,0
Sch O	12,8	31,2	31,2	++	+	24,8	0							17,3	49 000	81,0
W K	9,5	21,6	51,4			10,8	6,7							312	185 000	100,0
W K + 14 Wo	2,3	11,7	68,7			6,8	10,5	+	+					6,6	240 000	99,0
W K + 16 Wo	10,7	38,2	48,9			2,2	0							6,0	223 000	99,0
D H	12,1	14,3	48,3			20,9	4,4	3,9	0,5					8,9	325 000	99,0
D H + 17 Wo	10,1	31,0	39,1			19,8	0							6,4	53 400	99,5
H H	4,6	7,1	45,8			20,3	22,2	18,8	3,4	6,2	93,8	81,6	12,2	11,1		
G H	19,7	9,9	51,9			18,5	0							3,7	100 000	99,0
G H + 14 Wo	21,8	35,0	33,9			9,3	0							7,8	98 000	100,0
H K	9,7	17,6	28,6	17,0	11,6	39,5	4,6	+	+					18,7	24 400	100,0
K H	10,4	15,5	35,9	21,4	14,5	35,2	3,0							47,8	24 700	96,0
J H	12,0	8,5	70,1	10,3	59,8	6,0	3,4							7,1	116 000	99,0
J H + 14 Wo	18,7	35	42,5			3,8	0							3,4	146 000	99,0
F G	14,1	14,1	52,4			7,8	11,6	++	+					8,5	288 000	97,5
F G + 4 Wo	6,4	11,7	59,2			11,9	10,8	9,2	1,6					21	208 000	99,0
F G + 14 Wo	6,7	29,9	61,3			2,1	0							6	390 000	99,0
G A	1,6	9,7	47,2			14,4	27,1	++	+					17		100 0
G A + 5 Wo	3,8	25,2	50,3			9,4	11,3							6,6	87 000	99,0
N H [1]	5,7	15,9	39,7	22,7	17,0	34,1	4,6							65,5	6 500	91,0
Gi Ad	1,8	13,5	35,8	27,6	8,2	46,5	2,4	+	+					4,6	13 200	94,0
G E [1]	6,2	17,5	51,9	+++	+	23,1	1,3							33,3	18 000	94,5
M O	14,9	23,2	50 0			11,9	0							4,1	11 700	95,0
M A	5,9	25,5	43,1	++	+	25,5	0								25 200	99,0
Sch K (Milz) [1]	7 7	28 6	41,9	+++	+	15,5	6,3	1 6	4,7					63		

[1] B-Zell-Lymphom

III.6. IsE-Muster der SP aus Zellen von Patienten mit HZL

III.6.a. Verteilung der IsE der SP und ihre Tartratresistenz (Tab.VII, Abb.2)

Die stärkste Fraktion mononukleärer Zellen von Patienten mit HZL stellte IsE 3 mit 32,4 ± 8,5 % dar, gefolgt von IsE 2 (Tab.I). Gelelektrophoretisch war IsE 5 in allen Fällen von HZL nachzuweisen. Gegenüber anderen Zellpopulationen betrug der Anteil des IsE 5 19,8 ± 11,8 %. Die Tartratresistenz des IsE 5 ist in Abb.2 dargestellt. IsE 1,2 und 3 wurden praktisch vollständig, IsE 4 nur unvollständig gehemmt. Als einziges verhielt sich IsE 5 weitgehend resistent gegenüber Tartrat.

Tab.VII: IsE der SP (in %) und ihre Tartratresistenz aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Patienten mit HZL. (PLL = Prolymphozyten-Leukämie).

Haarzell	angereicherte	Isoenzyme in % der SP									TR				Ges. SP
Leukämie	Zellpopulation	1	2	3	a	b	4	5	a	b	4	5	a	b	(IE /10^7 Z)
K C (DD CLL)	Mononukl	4,8	10,3	33,3	.	..	14,0	37,6			6,4	93,6			230
O V (DD PLL)	Mononukl	8,2	23,0	29,7	15,9	13,8	21,2	17,9	14,6	3,3	18,1	81,9	68,8	13,1	64,0
D M	Mononukl	7,1	21,3	27,4	14,2	13,2	21,5	22,7	15,8	6,9	9,5	90,5	58,1	32,4	66,3
W F	Mononukl	4,8	25,2	40,3	17,0	23,3	17,7	12,0	8,9	3,1	6,7	93,3	76,7	16,6	68,8
R W	Mononukl	4,1	23,4	39,8	28,3	11,5	26,2	6,5	4,8	1,7	24,2	75,8	53,0	22,8	66,5
F K	Mononukl	7,7	18,1	48,2	28,9	19,3	12,9	13,1	6,5	6,6	9,5	90,5	46,5	44,0	68,6

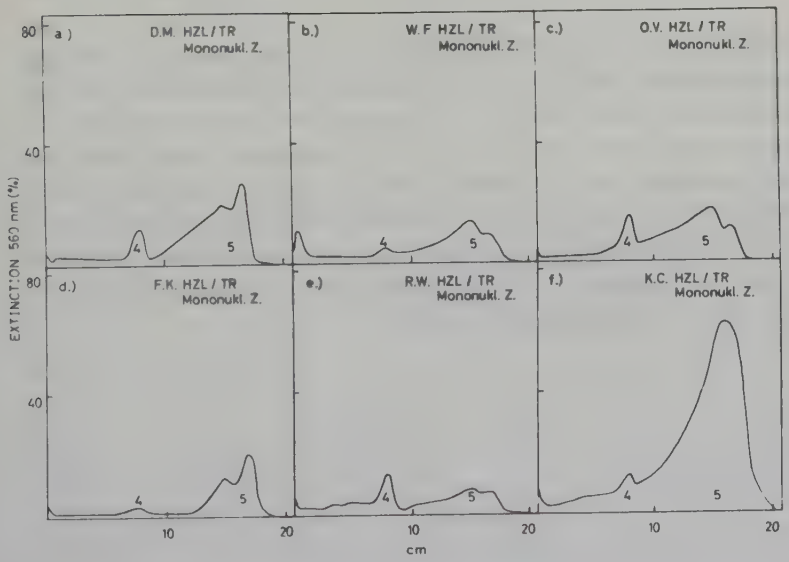


Abb.2: Gelelektrophoretische Darstellung der TRSP aus mononukleären Zellen von Patienten mit HZL. (TR = Tartratresistenz).

III.6.b. IsE-Muster der SP mononukleärer, adhärenter und nicht-adhärenter Zellen aus Venenblut und mononukleärer Zellen aus der Milz (Tab.VIII, Abb.3)

Es wurde versucht, HZ entsprechend ihrer Haftfähigkeit (19) durch ein Adhärenzverfahren anzureichern. Da auch Monozyten adhärent sind, umfaßte die adhärente Fraktion (Abb.3c) Monozyten und HZ, während die nicht-adhärente Fraktion (Abb. 3d) hauptsächlich Lymphozyten entsprach.
Vergleicht man diese beiden Fraktionen bei den Patientinnen R.R. und D.M., so fällt auf, daß die adhärente Fraktion gegenüber der nicht-adhärenten erwartungsgemäß einen geringeren Anteil des IsE 3 und höhere Anteile der IsE 4 und 5 aufwies. Aus den nicht-adhärenten Zellen der Patientin D.M. war kein IsE 5 zu isolieren.

Vergleicht man bei den Patienten R.R. und S.W. die IsE der mononukleären Zellen aus dem venösen Blut mit denen aus der Milz, so zeigten letztere geringere IsE 3-Anteile, aber wesentlich höhere Aktivitäten der Gesamt-SP sowie eine sehr viel stärkere IsE 5-Fraktion, deren Anteil demjenigen aus adhärenten Zellen glich. Der Prozentteil der HZ der Patientin R.R. lag bei den mononukleären Zellen aus dem Blut bei 56,8%, bei denen aus der Milz bei 95%, von denen jeweils 82% bzw. 89% TRSP-positiv waren.

Tab.VIII: Vergleich der IsE der SP (in %) aus mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut und der Milz, sowie aus Zellen der adhärenten und nicht-adhärenten Fraktion der mononukleären Zellen aus dem Blut.

Haarzell	angereicherte	Isoenzyme in % der SP									Ges. SP
Leukämie	Zellpopulation	1	2	3	a	b	4	5	a	b	(IE / 10^7 Z)
R R	Mononukl./ven.Bl	12,6	35,4	37,2	37,2		6,3	8,5	4,2	4,3	13,2
R R	Mononukl/Milz	5,0	36,5	18,8	(18,8)		7,2	32,5			85,0
R R	adharente Zellen Blut	3,7	27,4	20,2	14,9	5,3	14,9	33,8	23,5	10,3	27,0
R R	nicht adh. Zellen Blut	6,4	22,4	56,1	**	*	2,7	12,4			10,0
S W	Mononukl./ven Bl.	11,4	47,1	33,0			2,1	6,4	3,9	2,5	15,0
S W	Mononukl/Milz	19,7	34,8	31,8	28,0	3,8	6,1	7,6			21,0
D M	adhärente Zellen Blut	7,1	16,3	35,7	17,7	18,0	27,7	13,1	7,3	5,8	
D M	nicht adh. Zellen Blut	12,3	27,0	57,0	29,4	27,6	3,7	0			

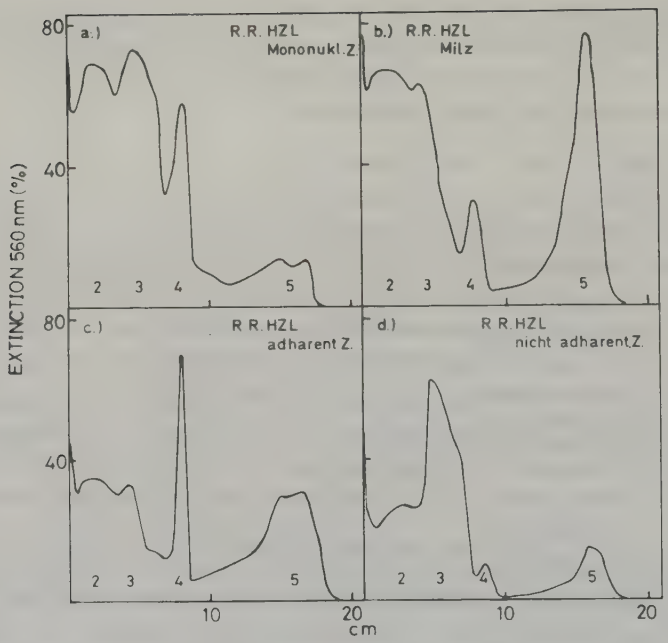


Abb.3: Darstellung der IsE-Fraktionen der SP aus Zellen einer Patientin mit HZL.

(a) mononukleäre Zellen aus dem Blut.

(b) mononukleäre Milzzellfraktion.

(c) adhärente Fraktion aus (a).

(d) zu (c) komplementäre Fraktion.

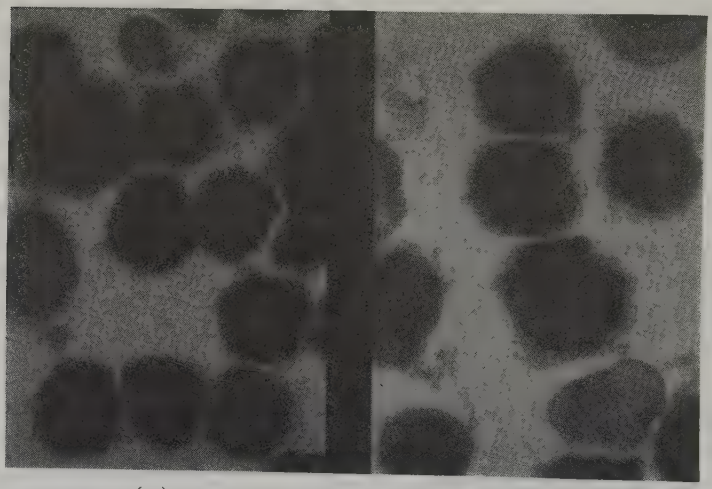
III.6.c. Vergleich von zytochemischem und gelelektrophoretischem Nachweis des IsE 5 der SP (Tab.IX, Abb.4)

Im Zellausstrich erwiesen sich nicht alle aufgrund morphologischer Kriterien identifizierte HZ als TRSP-positiv. So waren z.B. bei D.M. 20,4% der mononukleären Fraktion morphologisch als HZ gekennzeichnet, aber nur 18,4% waren TRSP-positiv. Bei F.K. waren es 5,9% bzw. 2,4%, bei W.R. 5,6% bzw. 1,8% und bei R.W. 16,7% bzw. 4,2%. Bei den Patientinnen O.V. und K.C. waren 58,9% bzw. 94,2% der mononukleären Fraktion als lymphoide Zellen zu identifizieren. Sie waren jedoch alle TRSP-negativ. Dagegen ergab die gelelektrophoretische Untersuchung einen starken Anteil der IsE 5-Fraktion von 17,9% bei O.V. und von 37,6% bei K.C.

Tab.IX: Vergleich der zytochemischen Darstellung der TRSP mit dem gelelektrophoretischen Nachweis des IsE 5 der SP bei 12 Patienten mit HZL.

Patienten mit HZL	TRSP Zytochem. %	Is E5 der SP Gelelektroph. %	Lymphoide Zellen im Diff. B.B. %	Leukozyten/µl
R.W.	4,2	6,5	35	10.900
F.K.	2,4	13,1	60	6.500
W.F.	1,8	12,0	55	7.800
D.M.	18,4	22,7	42	11.600
R.R.	45,0	8,5	76	5.500
M.H.	90,0	/	88	15.100
B.E.	3,6	/	77	9.000
P.S.	7,2	/	64	7.300
R.I.	6,0	5,0	75	13.800
S.W.	<1,0	6,4	68	4.800
K.C.	0	37,6	86	200.000
O.V.	0	17,9	89	20.000

Abb.4. zeigt als Beispiel den zytochemischen Vergleich der Aktivitäten der gesamten SP (a) und der TRSP (b) in HZ der Patientin R.R.



(a) (b)

Abb.4.: Enzymhistochemischer Nachweis der SP in HZ der Patientin R.R.
(a) Gesamt-SP.
(b) TRSP.

IV. D I S K U S S I O N

Die Heterogenität der SP wurde sowohl gelelektrophoretisch als auch säulenchromatographisch bewiesen, sodaß unter Berücksichtigung vergleichbarer Arbeitsbedingungen der Begriff "Isoenzym" (18) in Anlehnung an LI et al. (36,37) übernommen wurde. Diese Autoren beschrieben zunächst fünf, dann insgesamt sieben IsE der SP: IsE 0,1,2,3(3a,3b),4,5. IsE 0 ordneten sie den Gaucher-Zellen zu, IsE 1,2 und 4 den neutrophilen Granulozyten, IsE 1 und 4 den Monozyten, IsE 3 den Lymphozyten und Thrombozyten, IsE 3b den primitiven Blasten und IsE 5 den HZ.
Die Ergebnisse dieser Autoren konnten im Prinzip bestätigt werden (25,27,56).

Im Folgenden soll besonders das Vorkommen des IsE 5 wegen seiner Bedeutung für die Diagnose der HZL besprochen werden. Auf die übrigen IsE wird nur so weit eingegangen, als IsE 3 charakteristisch ist für Lymphozyten (Abb.1b) und IsE 4 für Monozyten (Abb.1c). Der minimale Anteil des IsE 4 gereinigter Lymphozytenpopulationen muß wahrscheinlich auf kontaminierende Monozyten zurückgeführt werden, da mit den bisherigen Anreicherungsmethoden eine komplette Trennung der mononukleären Zellen in die monozytäre und lymphozytäre Subfraktion nicht möglich ist (Tab.II).

Zuerst wiesen LI et al. (36) 1970 das IsE 5 gelelektrophoretisch in Lysaten von Leukozyten Gesunder sowie von Patienten mit infektiöser Mononukleose und CLL nach. Der Nachweis des IsE 5 in HZ gelang erst später (37). Dabei bestand eine Korrelation zwischen dem Anteil der HZ im Differentialblutbild und der Stärke der IsE 5-Fraktion in der Gelelektrophorese. Zusätzlich wurde IsE 5 in Leukozytenpräparationen von Patienten mit Lymphosarkom gefunden. Diesen Autoren gelang der Nachweis, daß sich IsE 5 im Gegensatz zu allen anderen IsE gegenüber Tartrat stabil verhält.

1971 bestätigten YAM et al. (54) die Identität des gelelektrophoretisch nachgewiesenen IsE 5 mit der zytochemisch darstellbaren TRSP. Ihr Versuch, gelelektrophoretisch IsE 5 aus den Blutzellen von Patienten mit CLL, AL und Lymphosarkom zu isolieren, mißlang zunächst. Dagegen gelang zytochemisch eine schwache Darstellung der TRSP in wenigen Lymphomzellen von Patienten mit CLL und Lymphosarkom. Bei späteren Untersuchungen fanden YAM et al. (55) eine gute Korrelation zwischen zytochemischen und gelelektrophoretischen Befunden in HZ, atypischen Lymphozyten von Normalpersonen, von Patienten mit infektiöser Mononukleose, CLL bzw. Lymphosarkom, in Lymphosarkomzellen sowie in Leukozyten von Patienten mit CML.
KATAYAMA et al. (31) beschrieben neben gleichmäßig hoher TRSP in HZ zusätzlich geringe TRSP in Lymphomzellen des Mb.Hodgkin, in Retikulosarkomzellen, Adenokarzinomzellen und in Nebennierenrindenzellen bei Hyperaldosteronismus.
MOVER et al. (43) versuchten, die Expression der TRSP semiquantitativ zu beurteilen. Dabei zeigte sich, daß sich die TRSP in HZ in der Regel am stärksten ausprägte, jedoch nicht in allen Zellen einer Population gleichmäßig gut. Ähnlich hohe TRSP fanden sie in malignem Prostatagewebe, in Epitheloidzellen des Mb.Hodgkin und der Sarkoidose sowie in Gaucher-Zellen.
Während WOESSNER et al. (53) die Expression der TRSP auch in anderen Lymphomzellen, die sich z.T. erst später morphologisch als HZ einordnen ließen, beobachteten, wiesen BURKE et al. (14) darauf hin, daß sie in den HZ eines Patienten mit HZL keine TRSP nachweisen konnten. CATOVSKY et al. (16) konnten zytochemisch nur in den HZ mit sehr hoher SP-Aktivität TRSP darstellen. Quantitative und qualitative Unterschiede der SP in HZ beschrieben auch SCHAEFER et al. (49). Nach der Erfahrung dieser Autoren sprach das Fehlen der TRSP nicht gegen die Diagnose einer HZL.
Neuerdings erscheinen in der Literatur Hinweise dafür, daß der zytochemische Nachweis der TRSP nicht nur ein regelmäßiges Phänomen für HZ sondern auch für Prolymphozyten zu

sein scheint (15,35,39,50).

Nach den vorliegenden Untersuchungen stellte sich IsE 5 nicht immer als einheitliche Fraktion dar. Meistens ließen sich zwei Komponenten auftrennen, die von uns als IsE 5a und 5b bezeichnet wurden. Es wurden keine weiteren Untersuchungen unternommen, um die Fraktionen 5a und 5b als echte IsE zu charakterisieren. Biochemische Untersuchungen anderer Autoren (34) enthalten keine Anhaltspunkte für die hier beschriebene Heterogeneität des IsE 5.
Gelelektrophoretisch wurde IsE 5 nie in Granulozyten und Thrombozyten Gesunder und nicht eindeutig in Zellen von Patienten mit CML bzw. AL nachgewiesen. Dagegen gelang seine Darstellung in den Lymphozyten und Monozyten aller untersuchter Gesunder, bei der überwiegenden Zahl der Patienten mit CLL und bei einem Patienten mit infektiöser Mononukleose. In den mononukleären Zellen aller Patienten mit HZL war sein Nachweis durchschnittlich sehr viel stärker positiv als bei allen anderen Zellarten (Tab.I).
Wie aus Tab.IX hervorgeht, konnte keine Korrelation zwischen gelelektrophoretischer Nachweisbarkeit des IsE 5 und zytochemischer Darstellbarkeit der TRSP einerseits und dem Anteil der HZ im Differentialblutbild andererseits festgestellt werden. Der Anteil der TRSP-positiven Zellen war meistens sehr viel niedriger als der der lymphoiden Zellen (Tab.IX).

Bei den Patientinnen K.C. und O.V. mit den Differentialdiagnosen CLL mit Follikellymphozyten bzw. Prolymphozyten-Leukämie konnte bei stark positivem gelelektrophoretischem Nachweis des IsE 5 im Ausstrich keine TRSP beobachtet werden. Umgekehrt war bei der Patientin R.R. bei einem sehr großen Anteil TRSP-positiver Zellen nur eine sehr kleine IsE 5-Fraktion zu isolieren.
Die Diskrepanz zwischen negativer zytochemischer Darstellbarkeit und positivem gelelektrophoretischem Nachweis könnte in der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Methoden begründet sein. Möglicherweise lag der durchschnittliche TRSP-

Gehalt der HZ dieser Patientinnen unterhalb der zytochemischen Nachweisbarkeitsgrenze. Es könnte daran gedacht werden, daß bei sehr hohen Leukozytenzahlen pro mm^3 der durchschnittliche Gehalt an TRSP pro Einzelzelle zytochemisch nicht mehr darzustellen ist.

Bei der Auftrennung der SP aus Prostata-Adenom- und -Carcinomgewebe gelang die Darstellung der IsE 1-4, nicht jedoch die des IsE 5. Auffallend sind aber unsere Beobachtungen, daß im Serum von Patienten mit Prostata-Carcinom neben den IsE 1-4 auch IsE 5 dargestellt werden konnte.
Die Auftrennung der SP aus dem Serum Gesunder blieb erfolglos. Es bleibt daher die Frage offen, woher die IsE 5-Fraktion in Seren von Patienten mit metastasierendem Prostata-Carcinom stammt.
Allgemein gilt, daß in der Regel saure Prostata-Phosphatase tartratlabil sein soll (20,29,44,45,52), es gibt jedoch auch Hinweise in der Literatur über Nachweise von tartratresistenter saurer Prostata-Phosphatase (10,23,43).

Als Schlußfolgerung kann aus den bisherigen Veröffentlichungen und den hier vorliegenden Ergebnissen entnommen werden, daß die TRSP zwar charakteristisch aber nicht spezifisch für HZ ist. Der fehlende zytochemische Nachweis der TRSP spricht nicht gegen die Diagnose einer HZL, wenn andere Symptome auf diese Erkrankung hindeuten (24,28). Die Indikation der Auftrennung der SP in ihre IsE scheint daher dann gegeben zu sein, wenn bei klinischem Verdacht auf eine HZL enzymhistochemisch keine TRSP nachgewiesen werden kann.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Aus Lysaten von normalen und leukämischen weißen Blutzellen sowie aus Prostatagewebe wurden die Aktivitäten der gesamten Sauren Phosphatase sowie die prozentualen Anteile der Isoenzyme der Sauren Phosphatase nach diskelektrophoretischer Auftrennung bestimmt. Dabei wurde festgestellt, daß das IsE 5 außer in Haarzellen auch in Monozyten und Lymphozyten von Normalpersonen sowie in den mononukleären Zellen der Mehrheit von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie nachzuweisen ist, nicht jedoch in Granulozyten und Thrombozyten Gesunder, nicht in Leukozyten von Patienten mit akuter Leukämie und chronisch myeloischer Leukämie und nicht in Adenom- bzw. Carcinomgewebe der Prostata. Der diskelektrophoretische Nachweis des IsE 5 in Zellen von Patienten mit Haarzell-Leukämie korrelierte nur selten mit der zytochemischen Darstellbarkeit der tartratresistenten Sauren Phosphatase. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Sauren Phosphatase kann als ergänzende Methode zur Diagnosestellung für diejenigen Patienten herangezogen werden, bei denen klinisch der Verdacht auf eine Haarzell-Leukämie besteht, enzymhistochemisch aber der Nachweis der tartratresistenten Sauren Phosphatase in den Lymphomzellen nicht gelingt.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ALLEN, J.M., and J. GOCKERMANN:
Electrophoretic separation of multiple forms of particle associated acid phosphatase.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 616-633 (1964)

2. ANDERSCH, M.A., and A.J. SZCZYPINSKI:
Use of p-nitrophenylphosphate as the substrate in determination of serum acid phosphatase.
Amer.J.Clin.Path. 17, 571-574 (1947)

3. AXLINE, S.G.:
Isozymes of acid phosphatase in normal and Calmette-Guerin bacillus-induced rabbit alveolar macrophages.
J.Exp.Med. 128, 1031-1048 (1968)

4. BAENZINGER, N.L., and Ph.W. MAJERUS:
Isolation of human platelets and platelet surface membranes.
Methods in Enzymology 31, 149-155 (1974)

5. BARKA, T.:
A simple azo-dye method for histochemical demonstration of acid phosphatase.
Nature 187, 248-249 (1960)

6. BARKA, T.:
Studies of acid phosphatase.
I. Electrophoretic separation of acid phosphatase of rat liver on polyacrylamide gels.
J.Histochem.Cytochem. 9, 542-547 (1961)

7. BARKA, T.:
Studies of acid phosphatases.
II. Chromatographic separation of acid phosphatases of rat liver.
J.Histochem.Cytochem. 9, 564-571 (1961)

8. BARKA, T., and P.J. ANDERSON:
Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler.
J.Histochem.Cytochem. 10, 741-753 (1962)

9. BARRNETT, R.J.:
Application of azo dye histochemistry to electron microscopy.
J.Histochem.Cytochem. 7, 298 (1959)

10. BAYER, P.M.:
Isoenzyme in der Diagnostik.
Med.Labor. 28, 173-177 (1975)

11. BÖYUM, A.:
Separation of white blood cells.
Nature 204, 793 (1964)

12. BÖYUM, A.:
Separation of leucocytes from blood and bone marrow.
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 21, Suppl. 97 (1968)

13. BOWEN, I.D., A.D. RYDER, and N.L. DOWNING:
An x-ray microanalytical azo dye technique for the localization of acid phosphatase activity.
Histochemistry 49, 43-50 (1976)

14. BURKE, J.S., G.E. BYRNE, and H. RAPPAPORT:
Hairy cell leukemia (leukemic reticuloendotheliosis).
Cancer 33, 1399-1410 (1974)

15. BUSKARD, N.A., D. CATOVSKY, A. OKOS, J.M. GOLDMAN, and D.A.G. GALTON:
Prolymphocytic leukemia: cell studies and treatment by leucapheresis.
Haematol.Bluttransf. 18, 237-253 (1976)

16. CATOVSKY, D., J.E. PETIT, D.A.G. GALTON, A.S.D. SPIERS, and C.V. HARRISON:
Leukemic reticuloendotheliosis ("hairy cell leukemia): a distinct clinico-pathological entity.
Brit.J.Haemat. 26, 9-27 (1974)

17. DAVIS, B.J., and L. ORNSTEIN:
High resolution enzyme localization with a new diazo reagent, "hexazonium pararosaniline".
J.Histochem.Cytochem. 7, 297-298 (1959)

18. DEAN, R.T.:
Multiple forms of lysosomal enzymes.
Front.Biol. 43, 349-382 (1975)

19. DEBUSSCHER, L., J.L. BERNHEIM, E. COLLARD-RONGE, A. GOVAERTS, R. HOOGHE, F.J. LEJEUNE, M. ZEICHER, and P.A. STRYCKMANS:
Hairy cell leukemia: Functional, immunologic, kinetic, and ultrastructural characterization.
Blood 46, 495-507 (1975)

20. FISHMAN, W.H., and F. LERNER:
A method for estimating serum acid phosphatase of prostatic origin.
J.Biol.Cehm. 200, 89-97 (1953)

21. FU, S.M., R.J. WINCHESTER, K.R. RAI, and H.G. KUNKEL:
Hairy cell leukemia: proliferation of a cell with phagocytic and B-lymphocyte properties.
Scand.J.Immunol. 3, 847-851 (1974)

22. GOLDBERG, A.F., and T. BARKA:
Acid phosphatase activity in human blood cells.
Nature 195, 297 (1962)

23. GOLDBERG, A.F., K. TAKAKURA, and R.L. ROSENTHAL:
Electrophoretic separation of serum acid phosphatase isoenzymes in Gaucher's disease, prostatic carcinoma and multiple myeloma.
Nature 211, 41-43 (1966)

24. HEYDEN, H.W.v., H.D. WALLER, G.R. PAPE, H.Chr. BENÖHR, H.J. BRAUN, K. WILMS, E.P. RIEBER und G. RIETHMÜLLER:
Haarzell-Leukämie.
I. Klinik, Zytochemie, Phagozytosefähigkeit von Haarzellen, Etablierung permanent wachsender Zellinien.
Dtsch.Med.Wschr. 101, 3-8 (1976)

25. HEYDEN, H.W.v., R. WEBER und O. NERKE:
Isoenzymmuster der sauren Phosphatasen aus normalen und leukämischen weißen Blutzellen.
in: Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin 83, 1113-1115 (1977)

26. HEYDEN, H.W.v., R. WEBER, H. STUCKSTEDTE, J.G. SAAL und K.O. FRESEN:
Isoenzym-Muster saurer Phosphatasen von Epstein-Barr-Virus-DNS enthaltenden, permanent wachsenden lymphoiden Zell-Linien.
Blut 35, 395-404 (1977)

27. HEYDEN, H.W.v., R. WEBER, O. NERKE, J.G. SAAL und W. STEIN:
Isoenzym-Muster saurer Phosphatasen aus normalen und leukämischen weißen Blutzellen.
Blut 35, 295-303 (1977)

28. HEYDEN, H.W.v.;
Haarzell-Leukämie.
II. Diagnostik und Verläufe von 12 Patienten mit Haarzell-Leukämie.
(Manuskript eingereicht)

29. HOLLANDER, V.P.:
Acid phosphatases.
The Enzymes, Vol.IV, 449-498 (1971)
Academic Press, New York and London

30. KAPLOW, L.S., and M.S. BURSTONE:
Cytochemical demonstration of acid phosphatase in haematopoietic cells in health and in various hematological disorders using azo dye techniques.
J.Histochem.Cytochem. 12, 805-811 (1964)

31. KATAYAMA, I., C.Y. LI, and L.T. YAM:
Histochemical study of acid phosphatase isoenzyme in leukemic reticuloendotheliosis.
Cancer 29, 157-164 (1972)

32. KING, G.W., P.E. HURTUBISE, A.L. SAGONE, A.F. LoBUGLIO, and E.N. METZ:
Leukemic reticuloendotheliosis.
A study of the origin of the malignant cell.
Am.J.Med. 59, 411-416 (1975)

33. LAM, K.W., P.T. DEKKER, J. CASTLEMAN, and L.T. YAM:
Studies of intracellular distribution of acid phosphatase 5 in the spleen cells of leukemic reticuloendotheliosis by isopycnic gradient centrifugation.
Clin.Chim.Acta 70, 289-295 (1976)

34. LAM, K.W., and L.T. YAM:
Biochemical characterization of the tartrate-resistant acid phosphatase of human spleen with leukemic reticuloendotheliosis as a pyro-phosphatase.
Clin.Chem. 23, 89-94 (1977)

35. LEDER, L.-D.:
Alkaline phosphatase and tartrate resistant acid phosphatase activity in cells of prolymphocytic leukemia.
Klin.Wschr. 56, 313-314 (1978)

36. LI, C.Y., L.T. YAM, and K.W. LAM:
Acid phosphatase isoenzyme in human leukocytes in normal and pathologic conditions.
J.Histochem.Cytochem. 18, 473-481 (1970)

37. LI, C.Y., L.T. YAM, and K.W. LAM:
Studies of acid phosphatase isoenzyme in human leukocytes. Demonstration of isoenzyme cell specifity.
J.Histochem.Cytochem. 18, 901-910 (1970)

38. LÖFFLER, H., A. ROUX, J. FISCHER, J.F. DESAGA, H. PRALLE und M. GRAUBNER:
Hairy cell - Leukämie.
Haematol.Bluttransf. 18, 255-272 (1976)

39. LÖFFLER, H., M. GRAUBNER, J.F. DESAGA, and M. JUNG:
Prolymphocytic leukemia with T cell properties and tartrate resistant acid phosphatase.
Haematology and Blood Transfusion 20, 175-178 (1977)

40. MAURER, H.R.:
Disk electrophoresis and related techniques of polyacrylamid gel electrophoresis.
W. de Gruyter, Berlin, New York, 1971

41. MENDE, S., H.-H. FÜLLE und I. WEISENFELS:
Diagnose und Differentialdiagnose der Haarzell-Leukämie ("Hairy cell leukemia", "Leukämische Reticuloendotheliose").
Blut 30, 163-174 (1975)

42. MÖBIUS, W., H.H. HENNEKEUSER, M. WESTERHAUSEN, C. STANG-VOSS und R. LESCH:
Haarzell-Leukämie.
Acta haemat. 53, 1-16 (1975)

43. MOVER, S., C.Y. LI, and L.T. YAM:
Semiquantitative evaluation of tartrate-resistant acid phosphatase activity in human blood cells.
J.Lab.Clin.Med. 80, 711-717 (1972)

44. PAIS, V.M., A.W. MANGOLD, and S.A. MAHONEY:
Fractionation and purification of prostatic acid phosphatase.
Invest.Urol. 12, 13-16 (1974)

45. RICHTERICH, R., J.P. COLOMBO und H. WEBER:
Ultramikromethoden im klinischen Laboratorium. VII. Bestimmung der sauren Prostata-Phosphatase.
Schw.Med.Wschr. 92, 1496-1500 (1962)

46. ROSALES, C.L., J.M. BENNET, and A.M. RUTENBERG:
Histochemical demonstration of leukocyte acid phosphatase in health and in disease.
Brit.J.Haemat. 12, 172-176 (1966)

47. ROZENSZAJN, L.A., A. GUTMAN, J. RADNAY, E.B. DAVID, and D. SHOHAM:
A study of the nature of "hairy" cells, with emphasis on enzymatic markers.
Am.J.Clin. Pathol. 66, 432-441 (1976)

48. SAAL, J.G., E.P. RIEBER, and G. RIETHMÜLLER:
Cell-mediated cytotoxicity for melanomatumor cells. Detection by a 3-H-proline release assay.
Scand.J.Immunol. 5, 455-466 (1976)

49. SCHAEFER, H.-E., K.-P. HELLRIEGEL, J. ZACH und R. FISCHER:
Zytochemischer Polymorphismus der sauren Phosphatase bei Haarzell-Leukämie.
Blut 31, 365-370 (1975)

50. SCHAEFER, H.-E., K.-P. HELLRIEGEL und R. FISCHER:
Vorkommen von tartrat-resistenter saurer Phosphatase in verschiedenen Zelltypen des lymphoretikulären und hämatopoetischen Systems.
Blut 34, 393-397 (1977)

51. TAVASSOLI, M., and R. YELENOSKY:
Platelet-derived acid phosphatase isoenzyme in the serum in thrombocythemia.
Am.J.Clin.Pathol. 67, 177-179 (1977)

52. WALTER, K. und Chr. SCHÜTT:
Phosphatasen. Saure und alkalische Phosphatase im Serum.
Methods in Enzymology I, 888-892 (1974)

53. WOESSNER, S., R. LAFUENTE, and J. SANS-SABRAFEN:
Unusual cytological appearance of hairy cell.
Lancet 1, 812 (1976)

54. YAM, L.T., C.Y. LI, and K.W. LAM:
Tartrate-resistant acid phosphatase isoenzyme in the reticulum cells of leukemic reticuloendotheliosis.
N.Engl.J.Med. 284, 357-360 (1971)

55. YAM, L.T., C.Y. LI, and H.E. FINKEL:
Leukemic reticuloendotheliosis. The role of tartrate-resistant acid phosphatase in diagnosis and splenectomy in treatment.
Arch.Intern.Med. 130, 248-256 (1972)

Anhang:

56. HEYDEN, H.W.v., R. WEBER und W. STEIN:
Vergleich zwischen zytochemischer und gelelektrophoretischer Darstellung der sauren Phosphatasen aus Leukozyten.
Blut 36, 225-229 (1978)

L e b e n s l a u f

Am 22.12.1953 wurde ich, Rosmarie W e b e r , als Tochter des Josef Weber und der Paula Weber in 7941 Dürmentingen, Kreis Biberach, geboren.
Nach dem Besuch der Volksschule in Dürmentingen wechselte ich 1964 auf das mathematisch-naturwissenschaftliche Kreisgymnasium in Riedlingen. 1972 legte ich dort am 15.6. das Abitur ab.

Im Sommersemester 1973 begann ich das Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen.
Während des Praktischen Jahres in Stuttgart wurde ich am Diakonissenkrankenhaus und am Olgahospital ausgebildet.
Am 22.1o.1979 bestand ich den dritten Teil der Ärztlichen Prüfung.